第 37 卷第 5 期 2017 年 3 月 | 生 态 学 报 ACTA ECOLOGICA SINICA | Vol.37,No.5 Mar.,2017

DOI: 10.5846/stxb201509181920
张顺, 林施泉, 孟凡旭, 吴敏, 许学伟, 王春生.太平洋克拉里昂-克利伯顿断裂带嘴刺目线虫多样性.生态学报,2017,37(5):1630-1638.
Zhang S, Lin S Q, Meng F X, Wu M, Xu X W, Wang C S.Nematode (Enoplida) diversity in sediment samples collected from the Clarion-Clipperton Fracture Zone.Acta Ecologica Sinica,2017,37(5):1630-1638.

太平洋克拉里昂-克利伯顿断裂带嘴刺目线虫多样性

张 顺[1,2], 林施泉[1], 孟凡旭[1], 吴 敏[2], 许学伟[1], 王春生[1,*]
1 国家海洋局第二海洋研究所, 杭州 310012
2 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058

摘要:从太平洋深海克拉里昂-克利伯顿断裂带(Clarion-Clipperton fracture zone,简称 CC 区)4 个站位采集的深海沉积物样品中检出 26 条嘴刺目(Enoplida)线虫个体。综合应用形态学和分子生物学方法,共鉴定嘴刺目线虫 6 科 8 属,其中尖口线虫科(Oxystominidae)个体数量最多,占总数的 57.7%,其次为前感线虫科(Anticomidae,19.2%)、光皮线虫科(Phanodermatidae,7.7%)、钩线虫科(Oncholaimidae, 7.7%)、烙线虫科(Ironidae, 3.8%)和矛线虫科(Enchelidiidae, 3.8%)。科、属组成与相邻站点同期采样所获的线虫近似,而丰度组成比例有所差异。分子生物学方法获得了线虫 rRNA 基因序列 16 条,经 GenBank 数据库比对,其与已有的序列相似性范围为 94%—99%,以此为依据可确定到科的水平和大部分属的水平(84.6%)。DNA 条形码比对结果和形态学鉴定结果有较高一致性,表明分子条形码技术可作为深海线虫鉴定的有效手段。系统发育分析结果显示,基于 18S 和 28S rRNA 基因序列,采用不同方法构建系统发育树,其分支结构基本一致;钩线虫科和矛线虫科聚类在一起,光皮线虫科和前感线虫科聚类在一起,显示出彼此间较近的遗传关系。

关键词:嘴刺目线虫;多样性;系统发育;克拉里昂-克利伯顿断裂带

Nematode (Enoplida) diversity in sediment samples collected from the Clarion-Clipperton Fracture Zone

ZHANG Shun[1,2], LIN Shiquan[1], MENG Fanxu[1], WU Min[2], XU Xuewei[1], WANG Chunsheng[1,*]
1 *Second Institute of Oceanography*, *Hangzhou* 310012, *China*
2 *College of life sciences*, *Zhejiang University*, *Hangzhou* 310058, *China*

Abstract: Marine free-living nematodes (Phylum Nematoda) are widespread and abundant in marine sediments, often representing 70%—90% of the benthic metazoans. However, marine nematode taxonomy is severely underdeveloped, and about only 4,000 species of free-living marine nematodes have been described. Nematode identification by using traditional morphological methods is time consuming and expensive. Some marine nematodes are small, displaying similar morphological characters and are difficult to identify by traditional methods. Molecular technology, or "barcoding," offers the potential of a fast and objective way of species identification. The small and large subunit ribosomal DNA (SSU rDNA and LSU rDNA) gene-based phylogenetic analysis is a powerful tool for clarifying evolutionary relationships among nematode taxa. The order Enoplida is one of the most important groups of marine nematodes. Many enoplids are possibly active predators, and play important ecological roles in marine environments. Here we reported the isolation of 26 nematodes, belonging to Enoplida, from sediment samples collected at four sites in the Clarion-Clipperton Fracture Zone of the Pacific Ocean. The specimens were preserved in DESS solution (20% dimethyl sulphoxide, 0.25 mol/L disodium EDTA pH 8.0, saturated with NaCl) immediately after collection. Each sediment sample was rinsed through a 38-μm sieve using filtered

基金项目:国际海域资源调查与开发"十二五"课题(DY125-14-E-02; DY125-22-QY-29)
收稿日期:2015-09-18; **网络出版日期**:2016-07-13
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wang-sio@163.com

seawater, and extracted using the Ludox flotation method. Nematodes were placed on temporary slides and observed using a Leica DM5500 microscope. After image capturing, each specimen was washed, cut into several pieces, transferred into micro-centrifuge tubes, and digested with Proteinase K. A series of frozen specimens was subsequently thawed and subjected to PCR amplification of the 18S rRNA gene and D3 expansion segments of the 28S rRNA gene. Sequences were analyzed and compared with published data from GenBank by means of a BLAST search. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining, maximum likelihood, and maximum parsimony methods with the MEGA5 program package, after multiple alignment of the data by CLUSTAL W. Based on morphological and molecular analyses, these 26 nematodes were classified into six families and eight genera, among which Oxystominidae was the most abundant family, accounting for 57.7%. The other families included Anticomidae (19.2%), Phanodermatidae (7.7%), Oncholaimidae (7.7%), Ironidae (3.85%), and Enchelidiidae (3.85%). At the family and genus level, the community composition at adjacent sites during the same period showed similar results, but the abundance was different. Sixteen sequences of rRNA gene were obtained in the present study and their similarity to the sequences in GenBank ranged from 94 to 99%. According to the results from BLAST, all sequences could be identified at the level of family, while 84.6% of the 16 sequences could be identified at the level of genus. The results from morphological and molecular analysis showed high consistency, which suggested that molecular barcoding is an efficient method to identify deep-sea nematodes. Phylogenetic trees constructed from the sequences of 18S and 28S rRNA gene showed similar topological structures; the species of Oncholaimidae and Enchelidiidae were clustered into one group, whereas those of Phanodermatidae and Anticomidae were clustered into another group, indicating their close genetic relationships.

Key Words: enoplida; diversity; phylogeny; Clarion-Clipperton Fracture Zone

自由生活海洋线虫属于线虫动物门,记录种约 4000 种,但尚有大量种类未被鉴定,估计全球线虫物种数量超过 2 万种[1]。海洋线虫是最丰富的后生动物类群,分布广、数量多。在多数生境中海洋线虫丰度可占后生动物数量的 70%—90%;在某些生境中,如有机质丰富的沉积物中,可达 90%以上[2]。在底栖食物链中,海洋线虫是较高级生物的食物来源,同时也影响低级生物群落组成,在食物链中具有承上启下作用[3]。

早期 Filipjev 以侧器作为主要性状,其它性状为补充,建立了线虫分类系统。首次提出包括当时已知全部种的海洋线虫分类系统,将线虫划分为 1 个纲 11 个目,并首次对线虫起源进行了讨论,提出线虫共同祖先是嘴刺目海洋线虫的观点[4]。依据 WORMS[5]最新数据,嘴刺目线虫包含 14 科,20 属,1742 种。嘴刺目是体长较长的海洋线虫类群,某些种类可达数毫米。研究表明,嘴刺目线虫是活跃的捕食者(在形态学分类单元上,有多个科的线虫具有排列复杂的齿),在小型底栖动物群落内具有重要的生态功能。然而,相对于陆生和寄生线虫,海洋嘴刺目线虫进化关系鲜有研究[1,6-7]。

形态学鉴定准确度受到多种因素影响,例如,不同生境中的同种线虫可表现出不同的外形特征,仅通过形态学特征将线虫鉴定到种水平难度大,线虫鉴定缺乏快速准确的技术方法。尽管线虫分类研究历史已有上百年,然而依然缺乏用于高级分类单元(如科以上分类单元)系统发育重建的同源形态性状的客观标准。

DNA 条形码(又称分子条形码)技术是通过对某一类 DNA 序列进行分析达到区分物种目的的技术。DNA 条形码在运用于海洋线虫研究中,有两类分子标记显示出较高的价值,分别是核糖体小亚基序列(SSU rDNA)和核糖体大亚基序列(LSU rDNA),其中核糖体小亚基序列在多数线虫系统发育分析中具有普遍适用性。其半保守序列可用来研究科以上分类单元的系统发育关系,其可变区序列能在科或属的水平上将线虫区分,甚至在种水平上区分不同的种类[8]。同时由于其序列包含较多的系统发育信息、较少的多态性,因此在揭示不同分类单元遗传关系时也非常有效。核糖体大亚基序列作为分子标记用于线虫鉴定的历史只有 20 多年,主要集中于 D2 或 D3 延伸片段[9],此分子标记具有显著的种内多态性,在区分某些类群的不确定种时具有较高价值,为系统发育分析提供遗传信息。其他分子标记,如转录间隔区(ITS)和线粒体基因(COI),也曾

应用于线虫分类研究,但其具有较高的种内变异性、大量插入,使比对工作较为困难[10],序列极难扩增。以往研究表明,形态学分类和 DNA 分子条形码鉴定结果之间存在较高的一致性[11-12]。

克拉里昂-克利伯顿断裂带富含多金属结核,具有重要经济价值。国际海底管理局承担了保护海洋环境免受破坏和过度开发的使命。为了顺利完成这一任务,需要对海洋生物进行研究。线虫作为海洋底栖生物的主要类群,其群落结构变化可反映环境变化。嘴刺目线虫是深海线虫最重要的类群之一,形态学资料较为齐全[1],已发布的核酸序列较多。然而以往关于嘴刺目线虫的研究主要集中于近海潮间带海滩[13],深海(如 CC 区)线虫研究报道鲜见,研究方法主要采用形态学分类法,分子技术应用少[14-15]。本研究结合形态学分类和分子生物学方法,研究 CC 区嘴刺目线虫的多样性,以期能初步探知该区嘴刺目线虫类群组成,并对其遗传关系进行探讨。

1 研究方法

1.1 样品采集分离和鉴定

采用箱式(9 cm ø 61 cm,BC)和多管(MC)取样的方式从太平洋 CC 区 4 个站位采集沉积物样品(表 1),立即固定于 DESS 溶液(20%的二甲基亚砜,0.2 M 乙二胺四乙酸二钠,加入氯化钠使溶液饱和,pH 8.0)[16]。

表 1 采样记录表

Table 1 Sampling sites

站位 Sites	经度(W) Longitude	纬度(S) Latitude	采样日期 Date	采样方法 Methods	站位深度/m Depth
BC05	146°53′27″	08°26′59″	2013-08-25	箱式	5217
BC06	144°56′4″	07°30′58″	2013-08-31	箱式	5062
MC03	154°04′19″	10°02′47″	2013-09-07	多管	5140
MC12	154°14′0″	10°10′1″	2013-09-08	多管	5193

BC: 箱式取样器 Box-Corer; MC: 多管取样器 Multi-Corer

沉积物先用孔径为 38 μm 的滤网过滤,再用 Ludox™(密度为 1.18 g/mL)重悬浮[17]。在解剖显微镜下,将线虫(嘴刺目)样本转移到载玻片上,制备线虫临时玻片。在显微镜(Leica DM5500)下用微分干涉和相差模式对线虫形态进行观察、拍照和测量。形态学鉴定主要依据 Gerlach、Rieman 和 Lorenzen 的方法[18-20]。显微观察后,为了防止线虫基因组降解,立即提取线虫基因组[21]。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增、鉴定

线虫从玻片分离,用无菌水清洗 3 次,清除线虫表面的化学试剂和其它杂质。依据线虫的大小,将线虫切成几段并转移至 0.5 mL 的 PCR 管中,PCR 中含有 20 μL 线虫裂解液(WLB)(50 mmol/L KCl,1% Gelatin, 10 mmol/L Tris-Cl pH 8.2, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.45%(v/v)Tween 20, 60 μg/mL 蛋白酶 K)。线虫样品在-70℃冻融 15 min,65 ℃消化 1 h 以上去除蛋白质,95 ℃处理 15 min 使蛋白酶 K 失活。冷却至室温后,于 13000 r/min离心 1 min。上清液即可作为 PCR 模板,用于两种片段(片段长度分别为~990 bp 的 18S rRNA gene 和~260 bp的 28S rRNA gene D3 区)扩增。18S rRNA gene 用 988F(5′-CTCAAAGATTAAGCCATGC-3′)和 1912R(5′-TTTACGGTCAGAA CTAGGG-3′)引物对扩增[22]。28S rRNA 基因 D3 区使用引物对 D3a(5′-GACCCGT CTTGAAACACGGA-3′)、D3b(5′-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3′)扩增。50 μL PCR 体系包括 ddH_2O 34.5 μL、10×Ex buffer 5 μL、引物各 2 μL(10 μM)、dNTP(每种 2.5 mmol/L)4 μL、Ex Taq(Takara, 5 U/μL)0.5 μL、模板 DNA 2 μL。PCR 反应条件为:98℃变性 10 s,退火 30 s,72℃延伸 1 min,循环 40 次,72 ℃延伸 10 min。引物对 988F、1912R 的退火温度为 49 ℃,引物对 D3a、D3b 的退火温度为 54 ℃。

PCR 产物用 2%的琼脂糖电泳检测、纯化后,连接到 pMD19-T,有插入片段的单克隆送铂尚生物技术(上海)有限公司测序。

1.3　数据分析

从 GenBank 网络数据库下载相关序列,使用 MEGA5 软件包内置的 Clustal W[23] 对序列进行比对,然后使用邻接法、最大似然法和最大简约法构建系统发育树。其中邻接法为双木村双参数模型,最大似然法(ML)采用田村 3 参数模型,其他参数为:G+I。最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和邻接树(NJ)自举值:MP 和 NJ 为 1000,ML 为 100。

2　研究结果

2.1　形态学鉴定

从 CC 区 4 个站位分离获得 26 个嘴刺目线虫个体(图 1),分属 6 个科(表 2 和表 3),线虫中文学名依据文献[24]。其中,尖口线虫科线虫 15 条(占线虫总数的 57.7%),包括 *Oxystomina* sp.1 条、*Halalaimus* sp.13 条及无法鉴定到属的线虫 1 条;前感线虫科线虫 5 条(19.2%),均为 *Anticoma* sp.;光皮线虫科线虫 2 条(7.7%),*Phanodermopsis* sp.和 *Crenopharynx* sp.各 1 条;钩线虫科线虫 2 条(7.7%),均为 *Viscosia* sp.;烙线虫科线虫 1 条(3.4%),为 *Syringolaimus* sp.;矛线虫科线虫 1 条(3.4%),为 *Bathyeurystomina* sp.。

箱式采样站位(BC 站)和多管采样站位(MC 站)均为 2 个采样点。BC 站和 MC 站共有的嘴刺目线虫包括剑口线虫科、前感线虫科、钩线虫科和光皮线虫科。BC 站样品中,前感线虫科为最主要类群;MC 站样品中,剑口线虫科为主要类群。烙线虫科和矛线虫科仅在 MC 站样品中发现,比例为 10%。



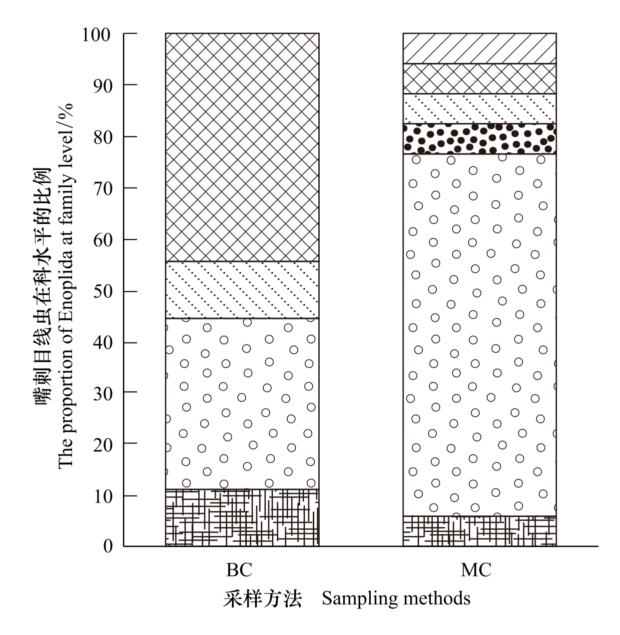


图 1　刺嘴目线虫类群组成

Fig.1　Community composition of Enoplid

表 2　鉴定线虫基因片段数量

Table 2　Numbers of gene segments of identified nematodes

科 Family	属 Genus	站位 Site	数量 Numbers	18S rRNA 基因	28S rRNA 基因
光皮线虫科	*Phanodermopsis*	BC05	1	1	0
	Crenopharynx	MC12	1	1	1
尖口线虫科	*Oxystomina*	BC05	1	1	0
	Halalaimus	BC05	1	1	0
	Halalaimus	BC06	1	0	0
	Halalaimus	MC03	3	0	0
	Halalaimus	MC12	8	3	3
	Oxystominid	MC03	1	0	0
矛线虫科	*Bathyeurystomina*	MC12	1	1	1
钩线虫科	*Viscosia*	BC06	1	0	1
	Viscosia	MC12	1	0	1
前感线虫科	*Anticoma*	BC05	4	0	0
	Anticoma	MC12	1	0	1
烙线虫科	*Syringolaimus*	MC12	1	0	0
总计 Total			26	8	8

本次研究的烙线虫科未获得核酸序列

形态学测量值上，嘴刺目线虫体长一般在 1 mm 以上，其中最长线虫 *Viscosia* sp.体长约 1.8 mm，最短的线虫 Oxystominid 长度仅为 0.2 mm。在尾长方面，*Crenopharynx* sp.最长，*Thalassomonhystera* sp.最短（表 3）。

表 3 嘴刺目线虫形态测量值/μm

Table 3 Morphometric data of Enoplida

站位 Sites	物种 Species	性别 Sex	长度 Length/mm	de Man 比值 de Man ratios			食道长度 Oesophagus length	最大直径 Maximum diameter	尾长 Tail length
				a	*b*	*c*			
BC06、MC12	*Viscosia* sp.	J	1773	37	6	9.5	298.5	48.5	190.6
MC03	*Thalassomonhystera* sp.	M	254	20	6	4	41.4	12.6	57.5
	J	492	27	7	11	39.3	18.3	45.4	
	F	725	28	17	2	42.9	25.3	314.2	
MC12	*Syringolaimus* sp.	J	1166	40	3	9	375	29.1	126.7
BC05	*Phanodermops* sp.	J	906	22	8	4	112.7	40.8	226.5
MC03	Oxystominid	J	205	14	3	3	67.3	14.1	81.4
BC05	*Oxystomina* sp.	J	1091	54	12	12	91.4	20.2	92.6
MC03、MC12	*Halalaimus* sp1	M	1518	52	NA	7	381.8	32.6	294.3
MC03	*Halalaimus* sp1	F	1100	56	4	17	247	19.4	66.3
BC05、BC06 MC03、MC12	*Halalaimus* sp1	J	940	42.7	4.5	6.3	273.2	26.0	204.9
MC12	*Halalaimus* sp2	J	1421	39	15	8	93.8	36.8	176
MC12	*Crenopharynx* sp.	J	1473	18	4	4	363.1	82.4	386.9
MC12	*Bathyeurystomina* sp.	J	1498	29	4	10	373.5	51.4	154.6
BC05、MC12	*Anticoma* sp.	J	944.8	22.6	7.8	9.4	154.1	45.9	108.1

M：雄性 male；F：雌性 Female；J：幼体 Juvenile；de Man 比值，*a*＝全长/最大体宽；*b*＝全长/食道长；*c*＝全长/尾长；如有多条线虫，则 *a*、*b*、*c* 取平均值；- NA：数据无法获得 not available

2.2 18S 和 28SrRNA 基因序列

采用分子生物学方法，共获得 16 条 DNA 序列（18S rRNA 基因序列和 28S rRNA 基因序列各 8 条，表 2）。序列已经提交到 GenBank，基因登陆号为 KR0811950- KR0811957 和 KR0811958- KR0811965。18S rRNA 基因序列片段长度约为 991 bp，其可变区比例低于保守区，具有较高的保守性。28S rRNA 基因序列片段长度为 306 bp，可变性区比例高于 18S rRNA 基因（表 4）。序列与数据库比对后均可确定到科的水平和 84.6%属的水平。尚有少量 18S 和 28S rRNA 基因序列在数据库中无法搜索到相近的线虫核酸序列，表明部分种类的线虫核酸序列尚未纳入核酸数据库中，线虫分子数据尚需补充。

表 4 18S 和 28S rRNA 基因的碱基组成

Table 4 Variability and composition of the sequences of the 18S and 28S rRNA genes

基因 Gene		18S rRNA gene	28S rRNA gene
碱基长度 Alignment size/bp		991	306
可变区 Variable region /bp (%)		275 (27.7)	109 (35.6)
保守区 Conservative region /bp (%)		704 (71.0)	194 (63.3)
简约信息位 Parsimony informative /bp (%)		166 (16.8)	83 (27.1)
碱基频率 Nucleotide frequencies/%	A	0.28	0.27
	T	0.27	0.22
	C	0.19	0.21
	G	0.26	0.30

碱基长度包括空位，可变区包括缺失片段；碱基频率 A，腺嘌呤 Adenine；T，胸腺嘧啶 Thymine；C 胞嘧啶 Cytosine；G 鸟嘌呤 Guanine

2.3 系统发育分析

采用 NJ、MP 或 ML 法进行基于 18S 和 28S rRNA 基因序列的系统发育分析结果显示，不同方法构建的系

统发育树分支结构基本一致(图 2)。28S rRNA 基因序列的系统发育树中,钩线虫科和矛线虫科聚类在一起,光皮线虫科和前感线虫科聚类在一起,分别显示出其彼此间较近的遗传关系。

2.4　形态学与分子数据比较分析

本研究获得的分子序列与 GenBank 数据库中的序列相似性为 94%—99%(表 5),分子条形码比对结果和形态学鉴定结果有较高的一致性。在科水平上,所有 DNA 条形码比对结果和形态学鉴定结果一致;在属水平上,87.5%的线虫 DNA 条形码比对结果与形态学鉴定结果一致。

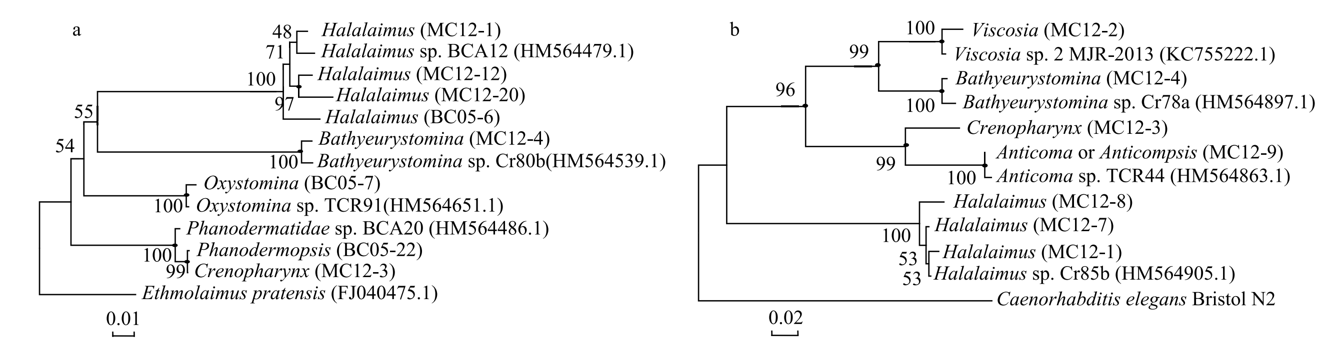


图 2　邻接法构建的系统发育树(a, 18S rRNA gene;b, 28S rRNA gene)

Fig.2　The phylogenetic tree (a, 18S rRNA gene; b, 28S rRNA gene)

圆心表明 3 种系统发育树(NJ、MP、ML)均一致。括号中为本次研究所用线虫的编号或 NCBI 的登陆号

表 5　线虫形态学鉴定和分子生物学鉴定结果比较

Table 5　Comparison between morphological identification and molecular data

线虫编号 ID	形态学鉴定 Morphological identification		18S rRNA 基因相似性 Similarity of 18S rRNA gene		28S rRNA 基因相似性 Similarity of 28S rRNA gene	
	科 Family	属 Genus	属 Genus	相似性/% Similarity	属 Genus	相似性/% Similarity
BC05-6	Oxystominidae	*Halalaimus*	*Halalaimus*	99		
BC05-7	Oxystominidae	*Oxystomina*	*Oxystomina*	99		
BC05-22	Phanodermatidae	*Phanodermops*	Phanodermatid	99		
MC12-3	Phanodermatidae	*Crenopharynx*	*Phanoderma*	99	*Phanoderma*	94
MC12-5	Enchelidiidae	*Bathyeurystomina*	*Bathyeurystomina*	99	*Bathyeurystomina*	99
MC12-20	Oxystominidae	*Halalaimus*	*Halalaimus*	98		
MC12-1	Oxystominidae	*Halalaimus*	*Halalaimus*	98	*Halalaimus*	98
MC12-12	Oxystominidae	*Halalaimus*	*Halalaimus*	99		
MC12-2	Oncholaimidae	*Viscosia*			*Viscosia*	98
MC12-7	Oxystominidae	*Halalaimus*			*Halalaimus*	99
MC12-8	Oxystominidae	*Halalaimus*			*Halalaimus*	99
MC12-9	Anticomidae	*Anticoma*			Anticomid	99
BC06-1	Oncholaimidae	*Viscosia*			*Viscosia*	98
MC12-10	Ironidae(1)	*Syringolaimus*				

(1) 未获得核酸序列

3　讨论

本次研究围绕 CC 区嘴刺目线虫开展,科水平上,尖口线虫科数量最多,烙线虫科数量最少,属水平上,*Halalaimus* 是主要的属,这与 Lambshead 等人研究结论一致[14]。此外,本次研究发现光皮线虫科线虫 2 条,占线虫总数的 6.9%,*Phanodermopsis* sp. 和 *Crenopharynx* sp. 各 1 条,这在以往 CC 区线虫研究文献中鲜见[14-15]。上述结果表明,CC 区尚有部分线虫种类未被发现,该区嘴刺目线虫多样性需进一步研究。

本研究中,所获得的线虫两种 rRNA 基因序列(18S rRNA 和 28S rRNA 基因)与 GenBank 数据库中的序列相似性为 94%—99%(表 5),分子条形码比对结果和形态学鉴定结果具有较高一致性,表明分子条形码技术是海洋自由生活线虫快速鉴定的有效手段。18S rRNA 基因由于保守性较高,常用于高级分类单元的系统分析;28S rRNA 基因往往表现出较高变异性、难以确定不同类群同源性及高级分类单元的遗传关系,研究者通常采用 28S rRNA 基因序列研究线虫属或更低分类水平之间的遗传关系[11]。形态学方法由于步骤繁琐、鉴定耗时长,影响线虫基因组完整性,从而降低 PCR 扩增效率[21]。同时,在 PCR 扩增过程中,容易扩增获得真菌或细菌序列。此外, DNA 制备技术对线虫序列获取效率具有影响,例如碱裂解法制备的基因组容易扩增获得真菌序列,这在研究线虫与微生物之间关系方面具有一定价值。

DNA 条形码技术是通过使用 DNA 基因片段作为条形码来对物种进行快速、准确识别的技术。它主要具有两个作用:1、利用已知种类对未知种类辅助鉴定;2、辨别往期研究种类之间的不同。对于研究充分、采样全面、基因和形态广泛研究的类群,DNA 条形码显示出较高的价值,特别是在已知种类对未知种类的辅助鉴定方面。本次研究中,经形态鉴定,MC12-1 号线虫属于 *Halalaimus* 属,但与其他 *Halalaimus* 属的线虫存在显著差异;系统发育分析上,MC12-1 号线虫与其他 *Halalaimus* 属线虫归为同一类群,但形成不同分支,表现出一定的遗传分化。这显示出 DNA 条形码在形态学鉴定结果的补充上具有一定价值。

DNA 条形码应用于海洋线虫鉴定中需要以下几步:(1)创建海洋线虫综合条形码数据库;(2)需要成熟方法,新的类群能比对和匹配到数据库中已有数据,或能进行有效补充;(3)条形码需要与分类学数据结合,应用于生物种类确定。截至 2015 年 7 月,GenBank 数据库有 104 个属、150 个种共计 600 多条海洋线虫条形码序列[25]。其中 41 种海洋线虫序列属于嘴刺纲,109 种属于色矛纲。嘴刺纲和色矛纲中,分子序列(SSU/LSU/COI)最多的是钩线虫科和色矛线虫科,它们包含的种均不超过 20 个;而 *Oncholaimus* 属仅包含了 30 种已经描述的种。与现有线虫多样性相比,具有分子数据的海洋线虫较少。为促进 DNA 条形码准确性,需增加不同种类海洋线虫的分子序列数据。

采用分子生物学方法对 CC 区嘴刺目线虫研究鲜有报道。依据近期嘴刺目线虫分子系统发育分析[1,26],嘴刺目线虫主要分为 5 大分支:(1):杆咽科(Rhabdolaimidae);(2):无咽科(Alaimidae)和烙线虫科;(3):似三孔线虫科(Tripyloididae)和长尾线虫科(Trefusiidae);(4):尖口线虫科、钩线虫科和矛线虫科;(5):腹口线虫科(Thoracostomopsidae)、嘴刺线虫科(Enoplidae)、光皮线虫科、狭线虫科(Leptosomatidae)、烙口线虫科、裸口线虫科(Anoplostomatidae)和前感线虫科。本研究结果显示,采用 18S 和 28S rRNA 基因分别构建系统发育树,运用不同建树方法,获得的系统发育树拓扑结构基本一致。遗传分析结果显示,钩线虫科和矛线虫科,遗传关系较近(NJ、ML 和 MP 法分别为:100%、100% 和 99%),这和形态学分类一致,它们都归为钩线虫超科(Oncholaimoidea),与往期结果一致,钩线虫超科为单系群;尖口线虫科所包含的属,在本次系统发育树中的拓扑结构不稳定,表明尖口线虫科可能为并系群,其中属之间关系需要进一步研究;光皮线虫科和前感线虫科的遗传关系较近(NJ、ML 和 MP 法分别为:99%、98% 和 98%),可归为嘴刺线虫超科(Enoploidea),关于其是否为单系群或并系群,以往争议多,本次研究支持其为单系群。为了确定线虫的遗传关系,后期的研究可以使用合并的序列(18S 和 28S rRNA 基因)进行系统发育分析或开展多基因综合分析,并参考口器等形态学特征。

分子条形码技术缺点是缺乏通用引物,导致核酸序列扩增效率不高。因此,未来线虫分子鉴定一方面需要设计或寻找更合适的引物、新的基因位点和采用宏基因组分析等新技术;另一方面需要改进形态学分析方法,如视频采集与编辑方法(VCE)[27]。未来对深海嘴刺目线虫的研究不仅要有形态分类和种群遗传关系研究,还需要结合形态可视化技术,如串型玻片扫描电镜、三维重建[28]、共聚焦成像和肌肉组织功能分析[29],增进对线虫形态学进化和功能多样性的了解。综合运用形态学和分子生物学的方法将有助于探知生物类群的同形种(Cryptic species),提升对海洋线虫生物多样性的认识,完善线虫的分类体系。

4 结论

CC 区嘴刺目线虫科水平上,尖口线虫科数量最多,烙线虫科数量最少;属水平上,*Halalaimus* 属是优势

属。本次研究发现的光皮线虫科线虫在以往 CC 区线虫研究文献中鲜见。这表明,CC 区尚有部分线虫种类未被发现,该区嘴刺目线虫多样性需进一步系统研究。所获得的分子序列与数据库中的序列比对结果显示,DNA 条形码比对结果和形态学鉴定结果有较高一致性,表明 DNA 条形码技术可作为深海线虫鉴定的有效手段。基于 18S 和 28S rRNA 基因序列,采用不同方法构建系统发育树,其分支结构基本一致;钩线虫科和矛线虫科聚类在一起,光皮线虫科和前感线虫科聚类在一起,显示出彼此间较近的遗传关系。

参考文献(References):

[1] Bik H M, Lambshead P J D, Thomas W K, Lunt D H. Moving towards a complete molecular framework of the Nematoda: a focus on the Enoplida and early-branching clades. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 353.

[2] Higgins R P, Thiel H. Introduction to the Study of Meiofauna. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1988.

[3] Heip C, Vincx M, Vranken G. The ecology of marine nematodes. Oceanography and Marine Biology, 1985, 23: 399-589.

[4] Filipjev I N. The classification of the free-living nematodes and their relation to the parasitic nematodes. Smithsonian Miscellaneous Collections, 1934, 89(6): 1-63.

[5] WoRMS Editorial Board. World Register of Marine Species. [2015-7-13]. http://www.marinespecies.org.

[6] van Megen H, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. Nematology, 2009, 11(6): 927-950.

[7] Pereira T J, Fonseca G, Mundo-Ocampo M, Guilherme B C, Rocha-Olivares A. Diversity of free-living marine nematodes (Enoplida) from Baja California assessed by integrative taxonomy. Marine Biology, 2010, 157(8): 1665-1678.

[8] Holterman M, Rybarczyk K, Van den Elsen S, Van Megen H, Mooyman P, Santiago P R, Bongers T, Bakker J, Helder J. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(1): 23-34.

[9] Kumari S, Decraemer W, Traversa D, Lišková M. Molecular and morphological delineation of *Longidorus poessneckensis* Altherr, 1974 (Nematoda: Dorylaimida). European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(2): 125-137.

[10] Derycke S, Fonseca G, Vierstraete A, Vanfleteren, J, Vincx M, Moens T. Disentangling taxonomy within the *Rhabditis* (*Pellioditis*) *marina* (Nematoda, Rhabditidae) species complex using molecular and morhological tools. Zoological Journal of the Linnean Society, 2008, 152(1): 1-15.

[11] De Ley P, De Ley I T, Morris K, Abebe E, Mundo-Ocampo M, Yoder M, Heras J, Waumann D, Rocha-Olivares A, Burr A H J, Baldwin J G, Thomas W K. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, 2005, 360(1462): 1945-1958.

[12] Bhadury P, Austen M C, Bilton D T, Lambshead P J D, Rogers A D, Smerdon G R. Evaluation of combined morphological and molecular techniques for marine nematode (*Terschellingia* spp.) identification. Marine Biology, 2008, 154(3): 509-518.

[13] Nicholas W L. Ultrastructure of the head of *Okranema eileenae* Greenslade and Nicholas, 1991 (Thoracostomopsidae: Nematoda). Journal of Nematology, 2002, 34(1): 50-61.

[14] Lambshead P J D, Brown C J, Ferrero T J, Hawkins L E, Smith C R, Mitchell N J. Biodiversity of nematode assemblages from the region of the Clarion-Clipperton Fracture Zone, an area of commercial mining interest. BMC Ecology, 2003, 3: 1.

[15] Miljutin D M, Miljutina M A, Arbizu P M, Galéron J. Deep-sea nematode assemblage has not recovered 26 years after experimental mining of polymetallic nodules (Clarion-Clipperton Fracture Zone, Tropical Eastern Pacific). Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2011, 58(8): 885-897.

[16] Yoder M, De Ley I T, King I W, Mundo-Ocampo M, Mann J, Blaxter M, Poiras L, De Ley P. DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. Nematology, 2006, 8(3): 367-376.

[17] de Jonge V N, Bouwman L A. A simple density separation technique for quantitative isolation of meiobenthos using the colloidal silica Ludox-TM. Marine Biology, 1977, 42(2): 143-148.

[18] Gerlach S A, Riemann F. The Bremerhaven Checklist of Aquatic Nematodes (Part 2). Bremen: Kommissionsverlag F. Leuwer, 1974: 405-734.

[19] Gerlach S A, Riemann F. The Bremerhaven Checklist of Aquatic Nematodes (Part 1). Bremen: Kommissionsverlag F. Leuwer, 1973: 1-504.

[20] Lorenzen S. The Phylogenetic Systematics of Freeliving Nematodes. London: The Ray Society, 1994.

[21] Bik H M, Hawkins L E, Hughes J A. Lambshead J D. Rapid decline of PCR amplification from genomic extracts of DESS-preserved, slide-mounted nematodes. Nematology, 2009, 11(6): 827-834.

[22] Holterman M, van der Wurff A, van den Elsen S, van Megen H, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(9): 1792-1800.

[23] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-5680.

[24] 张志南, 周红. 自由生活海洋线虫的系统分类学. 青岛大学海洋学报, 2003, 33(6): 891-900.

[25] da Silva N R R, da Silva M C, Genevois V F, Esteves A M, de Ley P, Decraemer W, Rieger T T, dos Santos Correia M T. Marine nematode taxonomy in the age of DNA: the present and future of molecular tools to assess their biodiversity. Nematology, 2010, 12(5): 661-672.

[26] Smythe A B. Evolution of feeding structures in the marine nematode order enoplida. Integrative and Comparative Biology, 2015, 55(2): 228-240.

[27] De Ley P, W Bert. Video capture and editing as a tool for the storage, distribution, and illustration of morphological characters of nematodes. Journal of Nematology, 2003, 34(4): 296-302.

[28] Bumbarger D J, Wijeratne S, Carter C, Crum J, Ellisman M H, Baldwin J G. Three-dimensional reconstruction of the amphid sensilla in the microbial feeding nematode *Acrobeles complexus* (nematoda: Rhabditida). Journal of Comparative Neurology, 2009, 512(2): 271-81.

[29] de Sena Oliveira I, Mayer G. Apodemes associated with limbs support serial homology of claws and jaws in Onychophora (velvet worms). Journal of Morphology, 2013, 274(10): 1180-1190.